

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/JP04/019160

International filing date: 15 December 2004 (15.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-423004  
Filing date: 19 December 2003 (19.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 10 February 2005 (10.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

15.12.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年12月19日

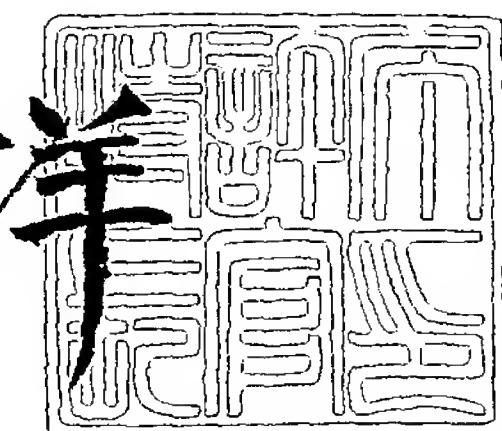
出願番号  
Application Number: 特願2003-423004  
[ST. 10/C]: [JP2003-423004]

出願人  
Applicant(s): 住友製薬株式会社  
株式会社高研

2005年 1月28日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川 洋



**【書類名】** 特許願  
**【整理番号】** 133211  
**【あて先】** 特許庁長官殿  
**【国際特許分類】** C12N 15/67  
                   C12N 15/06

**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 大阪府茨木市蔵垣内1丁目3番45号 住友製薬株式会社内  
**【氏名】** 水口 佳子

**【発明者】**  
**【住所又は居所】** 東京都中央区築地5-1-1  
**【氏名】** 落谷 孝広

**【特許出願人】**  
**【識別番号】** 000183370  
**【氏名又は名称】** 住友製薬株式会社

**【特許出願人】**  
**【識別番号】** 591071104  
**【氏名又は名称】** 株式会社高研

**【代理人】**  
**【識別番号】** 100121588  
**【弁理士】**  
**【氏名又は名称】** 五十部 穂  
**【電話番号】** 06-6466-5214

**【手数料の表示】**  
**【予納台帳番号】** 056546  
**【納付金額】** 21,000円

**【提出物件の目録】**  
**【物件名】** 特許請求の範囲 1  
**【物件名】** 明細書 1  
**【物件名】** 図面 1  
**【物件名】** 要約書 1  
**【包括委任状番号】** 0205876

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項 1】**

以下の工程 (a) 及び (b) を含む核酸導入法：

- (a) 核酸と細胞とを培地内で接觸させる工程、
- (b) 前記 (a) の工程の後、高濃度の金属塩溶液を前記 (a) の培地と接觸させる工程

**【請求項 2】**

核酸が一本鎖DNA、二本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNA、オリゴヌクレオチドまたはリボザイムである、請求項 1 記載の核酸導入法。

**【請求項 3】**

二本鎖DNAまたは二本鎖RNAが、直鎖状または環状の形態である、請求項 2 記載の核酸導入法。

**【請求項 4】**

環状二本鎖DNAが発現プラスミドの形態である、請求項 3 記載の核酸導入法。

**【請求項 5】**

オリゴヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド、2' -O- (2-メトキシ) エチル修飾核酸 (2', -MOE-修飾核酸) 、短い干渉RNA (siRNA) 、架橋型核酸 (LNA) 、ペプチド核酸 (PNA) またはモルフォリノ・アンチセンス核酸である、請求項 2 記載の核酸導入法。

**【請求項 6】**

核酸が生体内分解性の物質または生体由来物質との複合体若しくは封入体の形態である、請求項 1 ~ 5 いずれか記載の核酸導入法。

**【請求項 7】**

生体由来物質がアテロコラーゲンである、請求項 6 記載の核酸導入法。

**【請求項 8】**

工程 (a) の培地と接觸させる高濃度金属塩溶液の濃度が 0.1M ~ 3.0M の範囲内である、請求項 1 ~ 7 いずれか記載の核酸導入法。

**【請求項 9】**

工程 (a) の培地と接觸させる高濃度金属塩溶液の濃度が 0.5M ~ 2.0M の範囲内である、請求項 8 記載の核酸導入法。

**【請求項 10】**

工程 (a) の培地と接觸させる高濃度金属塩溶液の量が、工程 (a) の培地 500 μL 当たり 1 μL ~ 20 μL の範囲内である、請求項 1 ~ 9 いずれか記載の核酸導入法。

**【請求項 11】**

工程 (a) の培地と接觸させる高濃度金属塩溶液の量が、工程 (a) の培地 500 μL 当たり 2 μL ~ 10 μL の範囲内である、請求項 10 記載の核酸導入法。

**【請求項 12】**

金属塩溶液が二価金属の塩化物溶液である、請求項 1 ~ 11 いずれか記載の核酸導入法。

**○****【請求項 13】**

二価金属の塩化物溶液が塩化カルシウム溶液である、請求項 12 記載の核酸導入法。

**【請求項 14】**

固体金属塩または高濃度金属塩溶液を成分として含有する核酸導入剤。

**【請求項 15】**

請求項 1 ~ 13 いずれか記載の核酸導入法のために用いられる、請求項 14 記載の核酸導入剤。

**【請求項 16】**

高濃度金属塩溶液の濃度が 0.1M ~ 6.0M の範囲内である、請求項 14 または 15 記載の核酸導入剤。

**【請求項 17】**

高濃度金属塩溶液の濃度が $0.5\text{ M} \sim 4.0\text{ M}$ の範囲内である、請求項 16 記載の核酸導入剤。

**【請求項 18】**

金属塩が二価金属の塩化物である、請求項 14～17 いずれか記載の核酸導入剤。

**【請求項 19】**

二価金属の塩化物が塩化カルシウムである、請求項 18 記載の核酸導入剤。

**【請求項 20】**

請求項 14～19 いずれか記載の核酸導入剤を含有する核酸導入用キット。

**【請求項 21】**

請求項 14～20 いずれか記載の核酸導入剤またはキットの、核酸導入における使用。

【書類名】明細書

## 【発明の名称】新規な核酸導入法

【技術分野】

[0 0 0 1]

【0001】 本発明は、新規な核酸導入法に関する。より詳細には、本発明は、高濃度の金属塩溶液を利用した新規な核酸導入法に関する。

## 【背景技術】

100021

ゲノムサイエンスの発展により新しい疾患関連遺伝子が数多く発見され、これらの遺伝子の機能解析が急務となっている。現在汎用されている遺伝子の機能解析手法であるDNAマイクロアレイを用いたトランскriプトームや酵母two-hybrid法では、直接培養細胞内における機能を解析することは困難である。このため、治療標的分子の同定および治療創薬への直接的な結びつけを可能とするための、細胞もしくは個体レベルでの遺伝子機能の網羅的な解析技術の確立が望まれている。細胞および固体レベルでの解析では、評価対象とする遺伝子の配列をもとに核酸を利用して遺伝子がコードするmRNAを細胞内で過剰発現もしくはノックダウンさせ、その結果生じる細胞の機能変化を解析する手法が利用される。近年、細胞の機能をマルチイメージアナライザーにより様々なパラメーターで解析する方法が確立され、これを用いることにより細胞レベルでの網羅的な遺伝子機能解析も可能となっていることから、遺伝子発現を調節する手段の確立は遺伝子の機能解析の重要な課題となっている。

[0003]

遺伝子の発現を制御する核酸として、遺伝子過剰発現にはプラスミドDNA(pDNA)やウイルスベクターが、遺伝子のノックダウンにはアンチセンスDNA(AS-DNA)や短い干渉RNA(short interfering RNA; siRNA)などが用いられる。これら核酸と細胞膜は共にアニオン性を示し電気的に反発してしまうため、核酸を単独で直接細胞内に導入することは困難である。このため、細胞を用いた遺伝子機能解析では、ウイルスベクター法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、リポフェクション法、高分子ミセルベクター法など、これまでに開発された核酸の細胞内導入方法の利用が必要となる。

[ 0 0 0 4 ]

【0004】  
ウイルスベクター法（非特許文献1を参照）は、ウイルスベクター自体が細胞への感染能力を保持しているため、目的の遺伝子をウイルスベクターに挿入し細胞に添加するだけでは遺伝子が細胞に導入され、高効率で目的とする遺伝子を発現することができる。しかし、この方法では感染により細胞内に核酸が導入されるため、感染に対する防御機構などが細胞に生じる結果、本来目的とする遺伝子の機能の検出にノイズが生じる恐れがある。また、ウイルスベクターに挿入可能な遺伝子の大きさに制限があること、遺伝子の導入およびウイルスの増幅と精製作業が煩雑であることなどから、多種類の遺伝子機能の網羅的解析には適さない。

[0.0.0.5]

pDNA、AS-DNA、siRNAの細胞内への導入に関しては、上記のエレクトロポレーション法（非特許文献2を参照）、リン酸カルシウム共沈法（非特許文献3を参照）、DEAE-デキストラン法（非特許文献4を参照）、リポフェクション法（非特許文献5を参照）、または高分子ポリマーを用いた方法（非特許文献6を参照）などの利用が必要となる。

【0006】

【0006】 エレクトロポレーション法は細胞を核酸溶液中に懸濁して直流高電圧のパルスをかけることで細胞の膜透過性を亢進させて導入する方法である。この方法は高効率で核酸を導入することができる反面、細胞へのダメージが大きいことを特徴としており、核酸導入後の細胞機能変化の解析を目的とする場合には適さない。

【0007】

リン酸カルシウム共沈法は細胞の食作用を利用して核酸を導入する方法である。この方

法は再現性が乏しく、また導入効率も悪い。そのため安定した遺伝子導入が必要となる遺伝子の機能解析には適さない。

### 【0008】

DEAE-デキストラン法、リポフェクション法および高分子ポリマーを用いた方法は、細胞膜との膜融合を利用して核酸を導入する方法である。これらの方法のなかでは、導入効率や簡便性、汎用性、再現性という点でリポフェクション法が最も優れている。しかしリポフェクション法では細胞毒性が高いことが知られているため、細胞のビアビリティが重要である遺伝子の機能解析には問題が残る。またリポフェクション法では、細胞への導入に先立ってリポソーム試薬と核酸を混合して複合体を形成させる必要があるが、再現性が高くはない。複合体調製時の微妙な差によって細胞への導入効率が異なってくることから、高いとはいえた複合体調製時に細心の注意が必要となり、操作が煩雑となる多数の核酸を取り扱う場合には個々の操作に細心の注意が必要となり、操作が煩雑となる。

### 【0009】

以上から、細胞レベルで多数の遺伝子機能を網羅的に解析するためには、低細胞毒性であり簡便かつ効率的に細胞内に核酸を導入する方法の開発が望まれている状況にあった。

### 【0010】

【非特許文献1】Mah C et al, Virus-based gene delivery systems., Clin Pharm acokinetic. 2002;41(12):901-11.

【非特許文献2】Gehl J, Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research., Acta Phisiol scand. 2003;117(4):437-47.

【非特許文献3】Batard P et al, Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection., Gene, 2001;270:61-8.

【非特許文献4】Holter W et al, Efficient gene transfer by sequential treatment of mammalian cells with DEAE-dextran and deoxyribonucleic acid., Exp Cell Res. 1989;184(2):546-51

【非特許文献5】Rocha A et al, Improvement of DNA transfection with cationic liposomes., L Physiol Biochem. 2002;58(1):45-56

【非特許文献6】De Smedt SC, et al, Cationic polymer Based Gene Delivery Systems., Pharm. Res. 2000;17(2):113-26

### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

##### 【0011】

本発明の目的は、低細胞毒性で簡便かつ高効率で細胞へ核酸を導入することのできる、新規な核酸導入法を提供することにある。

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0012】

本発明者らは、核酸（単独）と細胞とを培地中で混合し、その後高濃度の塩化カルシウム溶液を培地に添加したところ、驚くべきことに、核酸が効率よく細胞に導入されその機能を発現できることを見出した。この新たな知見から、本発明者らは、塩化カルシウム、さらには金属塩全般について、新規な核酸導入剤として利用できるとの確信を得た。本発明はこのような知見に基づき完成するに至ったものである。

##### 【0013】

すなわち本発明は、下記に掲げるものである：

(1) 以下の工程 (a) 及び (b) を含む核酸導入法：

(a) 核酸と細胞とを培地中で接触させる工程、

(b) 前記 (a) の工程の後、高濃度の金属塩溶液を前記 (a) の培地と接触させる工程

、(2) 核酸が一本鎖DNA、二本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNA、オリゴヌク

レオチドまたはリボザイムである、前記（1）記載の核酸導入法、

（3）二本鎖DNAまたは二本鎖RNAが、直鎖状または環状の形態である、前記（2）記載の核酸導入法、

（4）環状二本鎖DNAが発現プラスミドの形態である、前記（3）記載の核酸導入法

、（5）オリゴヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ホスホチオエートオリゴデオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシ)エチル-修飾核酸（2'-MOE-修飾核酸）、短い干涉RNA（siRNA）、架橋型核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）またはモルフォリノ・アンチセンス核酸である、前記（2）記載の核酸導入法、

（6）核酸が生体内分解性の物質または生体由来物質との複合体若しくは封入体の形態である、前記（1）～（5）いずれか記載の核酸導入法、

（7）生体由来物質がアテロコラーゲンである、前記（6）記載の核酸導入法、

（8）工程（a）の培地と接触させる高濃度金属塩溶液の濃度が0.1M～3.0Mの範囲内である、前記（1）～（7）いずれか記載の核酸導入法、

（9）工程（a）の培地と接触させる高濃度金属塩溶液の濃度が0.5M～2.0Mの範囲内である、前記（8）記載の核酸導入法、

（10）工程（a）の培地と接触させる高濃度金属塩溶液の量が、工程（a）の培地500μL当たり1μL～20μLの範囲内である、前記（1）～（9）いずれか記載の核酸導入法、

（11）工程（a）の培地と接触させる高濃度金属塩溶液の量が、工程（a）の培地500μL当たり2μL～10μLの範囲内である、前記（10）記載の核酸導入法、

（12）金属塩溶液が二価金属の塩化物溶液である、前記（1）～（11）いずれか記載の核酸導入法、

（13）二価金属の塩化物溶液が塩化カルシウム溶液である、前記（12）記載の核酸導入法、

（14）固体金属塩または高濃度金属塩溶液を成分として含有する核酸導入剤、

（15）前記（1）～（13）いずれか記載の核酸導入法のために用いられる、前記（14）記載の核酸導入剤、

（16）高濃度金属塩溶液の濃度が0.1M～6.0Mの範囲内である、前記（14）または（15）記載の核酸導入剤、

（17）高濃度金属塩溶液の濃度が0.5M～4.0Mの範囲内である、前記（16）記載の核酸導入剤、

（18）金属塩が二価金属の塩化物である、前記（14）～（17）いずれか記載の核酸導入剤、

（19）二価金属の塩化物が塩化カルシウムである、前記（18）記載の核酸導入剤、

（20）前記（14）～（19）いずれか記載の核酸導入剤を含有する核酸導入用キット、

（21）前記（14）～（20）いずれか記載の核酸導入剤またはキットの、核酸導入における使用、

（22）以下の工程（a）及び（b）を含む核酸導入法：

（a）核酸と細胞とを培地中で接触させる工程、

（b）前記（a）の工程の後、高濃度の塩化カルシウム溶液を前記（a）の培地と接触させる工程、

（23）核酸が一本鎖DNA、二本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNA、オリゴヌクレオチドまたはリボザイムである、前記（22）記載の核酸導入法、

（24）二本鎖DNAまたは二本鎖RNAが、直鎖状または環状の形態である、前記（23）記載の核酸導入法、

（25）環状二本鎖DNAが発現プラスミドの形態である、前記（24）記載の核酸導入法、

(26) オリゴヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ホスホロチオエトオリゴデオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシ)エチル-修飾核酸(2'-MOE-修飾核酸)、短い干渉RNA(siRNA)、架橋型核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)またはモルフォリノ・アンチセンス核酸である、前記(23)記載の核酸導入法、

(27) 核酸が生体内分解性の物質または生体由来物質との複合体若しくは封入体の形態である、前記(22)～(26)いずれか記載の核酸導入法、

(28) 生体由来物質がアテロコラーゲンである、前記(27)記載の核酸導入法、

(29) 工程(a)の培地と接触させる高濃度塩化カルシウム溶液の濃度が0.1M～3.0Mの範囲内である、前記(22)～(28)いずれか記載の核酸導入法、

(30) 工程(a)の培地と接触させる高濃度塩化カルシウム溶液の濃度が0.5M～2.0Mの範囲内である、前記(29)記載の核酸導入法、

(31) 工程(a)の培地と接触させる高濃度塩化カルシウム溶液の量が、工程(a)の培地500μL当たり1μL～20μLの範囲内である、前記(22)～(30)いずれか記載の核酸導入法、

(32) 工程(a)の培地と接触させる高濃度塩化カルシウム溶液の量が、工程(a)の培地500μL当たり2μL～10μLの範囲内である、前記(31)記載の核酸導入法、

(33) 固形塩化カルシウムまたは高濃度塩化カルシウム溶液を成分として含有する核酸導入剤、

(34) 前記(22)～(32)いずれか記載の核酸導入法のために用いられる、前記

(33) 記載の核酸導入剤、

(35) 高濃度塩化カルシウム溶液の濃度が0.1M～6.0Mの範囲内である、前記

(33) または(34)記載の核酸導入剤、

(36) 高濃度塩化カルシウム溶液の濃度が0.5M～4.0Mの範囲内である、前記

(35) 記載の核酸導入剤、

(37) 前記(33)～(36)いずれか記載の核酸導入剤を含有する核酸導入用キット、ならびに

(38) 前記(33)～(37)いずれか記載の核酸導入剤またはキットの、核酸導入における使用。

### 【発明の効果】

#### 【0014】

本発明の新規な核酸導入法は、簡便かつ低細胞毒性で導入効率が高く、しかもローコストである。また細胞や核酸の種類を問わず、幅広く用いることができる。

### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0015】

本発明は、少なくとも以下の工程(a)及び(b)：

(a) 核酸と細胞とを培地中で接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、高濃度の金属塩溶液を前記(a)の培地と接触させる工程

、を含む核酸導入法を提供する。

#### 【0016】

本発明の核酸導入法において導入に用いられる核酸は、方法の原理上、その種類に制限は無くどのような核酸であっても導入対象として用いることができる。すなわちポリヌクレオチド(DNA、RNA)、オリゴヌクレオチド、またはリボザイム等のいずれの核酸であっても良く、また一本鎖・二本鎖およびこれらの類縁体のいずれの形態であっても良い。すなわち本発明の核酸として具体的には、一本鎖DNA、二本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNA、オリゴヌクレオチドまたはリボザイム等が挙げられる。

#### 【0017】

本発明の核酸が二本鎖DNAまたは二本鎖RNAである場合、直鎖状または環状のいず

れの形態であっても良い。さらに本発明の核酸が環状二本鎖DNAの場合、プラスミドの形態とすることができます。当該プラスミドは、発現プラスミドまたは非発現プラスミドのいずれの形態であっても良い。

本発明の核酸が一本鎖DNAまたは一本鎖RNAである場合、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれも用いることができる。

#### 【0018】

本発明の核酸がオリゴヌクレオチドである場合、導入するオリゴヌクレオチドの種類に制限はなく、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチドまたはこれらの類縁体のいずれも用いることができる。具体的には、デオキシリボヌクレオチド(DNA)、リボヌクレオチド(RNA)、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシ)エチル-修飾核酸(2'-MOE-修飾核酸)、短い干渉RNA(small interfering RNA: siRNA)、架橋型核酸(Locked Nucleic Acid: LNA; Singh, et al, Chem. Commun., 455, 1 998)、ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid: PNA; Nielsen, et al., Science, 254, 14 97, 1991)、またはモルフォリノ・アンチセンス核酸(Morpholino antisense; Summerton and Weller, Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 7, 187, 1997)などを例示することができる。

#### 【0019】

前記核酸は、細胞培養に支障のない溶媒に溶解して導入に用いることができる。当該溶媒としては、例えば蒸留水、生理的食塩水、HEPES緩衝液(シグマ社)、TRIS緩衝液(シグマ社)、PBS緩衝液(Invitrogen社)、細胞培養培地等を挙げることができる。

#### 【0020】

前記核酸は、細胞毒性のない生体内分解性の物質や生体由来物質と複合体を形成した形態、あるいはこれらの物質に封入された形態であっても良い。ここで生体内分解性の物質としては、例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸およびこれらの共重合体やラクトン系ポリマー、ポリエチレンギリコール系ポリマー等を挙げることができる。また生体由来物質としては、例えばキトサン、ゼラチン、アテロコラーゲン等を挙げることができる。核酸とこれら生体内分解性の物質や生体由来物質との複合体あるいは封入体の作製は、例えば文献、Panyman et al, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells ant tissue., Adv Drug Deliv Rev. 2003;55(3):329-47, Li XW et al, Sustained expression in mammalian cells with DNA complexed with chitosan nanoparticles., Biochim Biophys Acta. 2003;1630(1):7-18などに従い行うことができる。

前記生体内分解性の物質や生体由来物質と複合体あるいは封入体を形成することにより核酸は安定化されかつ徐放化されることから、当該複合体あるいは封入体を細胞内に導入することにより、核酸の効果の持続を図ることができる。

#### 【0021】

本発明の核酸導入法において用いられる細胞は、方法の原理上、適応細胞種に制限はない。具体的には、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、神経芽細胞、リンパ芽球、浮遊細胞、星状膠細胞、円形細胞、紡錘細胞、アメーバ様細胞などに対して本発明の核酸導入法を適用することができる。

#### 【0022】

本発明の核酸導入法において用いられる培地は、細胞が死滅せず、かつ本発明の核酸導入法による細胞内への核酸の取り込みに支障をきたさないような培地であれば、如何なる培地であっても良い。具体的には、通常の細胞培養に用いられる培養用培地、緩衝液、または血清をさらに含有する培養用培地や緩衝液が挙げられる。

#### 【0023】

ここで培養用培地としては、各々の細胞に合った培養用培地であればどのような培地であっても良い。例えばRPMI1640(Invitrogen社)、DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIA(Invitrogen社)、F-10 Nutrient Mixture(Invitrogen社)、F-12 Nutrient Mixture(Invitrogen社)、Iscove's Modified Dulbecco's Media(Invitrogen社)またはMINIMUM ESSENTIAL MEDIA(Invitrogen社)などが例示される。

また緩衝液としては、HEPES緩衝液（シグマ社）、TRIS緩衝液（シグマ社）、PBS緩衝液（Invitrogen社）などが例示される。

#### 【0024】

また血清としては、ウシ胎児血清、ウシ血清、仔ウシ血清、ウマ血清などが例示される。培地中の血清の濃度は、細胞培養に適した濃度であればどのような濃度であっても良い。好ましくは0～20%（v/v）の範囲が挙げられ、より好ましくは5～10%（v/v）の範囲が挙げられる。

#### 【0025】

本発明の核酸導入法において用いられる「金属塩溶液」は、細胞培養に影響しない範囲内であれば、如何なる金属塩溶液を用いても良い。細胞培養に影響するか否かは、細胞培養液に金属塩溶液を添加した場合としない場合とで細胞増殖速度（細胞密度）等を比較することにより、容易に調べることができる。

ここで金属塩とは、具体的には、カルシウム、カリウム、マグネシウム、ナトリウム、マンガン、鉄、銅、または亜鉛等の金属の塩が挙げられる。当該金属の塩として、より具体的には、例えば前記金属の塩酸塩、リン酸塩、硫酸塩、炭酸塩、または硝酸塩等が挙げられる。好ましくは前記金属の塩酸塩が挙げられ、より好ましくは二価金属の塩化物が挙げられる。

ここで二価金属の塩化物としては、具体的には塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化亜鉛、塩化鉄、塩化マンガン等が例示され、好ましくは塩化カルシウムが挙げられる。すなわち本発明の最も好ましい金属塩溶液は塩化カルシウム溶液である。

以上に示した金属塩は、単独で、若しくは2種以上を組み合わせることにより、本発明の金属塩溶液の成分とすることができる。

#### 【0026】

本発明の核酸導入法において用いられる金属塩溶液（好ましくは塩化カルシウム溶液）は、高濃度の金属塩溶液である。ここで「高濃度」とは、0.1M以上の濃度であることを指す。具体的には0.1M～3.0Mの範囲が挙げられ、好ましくは0.3M～3.0Mの範囲が、より好ましくは0.5M～3.0Mの範囲が、さらに好ましくは0.5M～2.5Mの範囲が、特に好ましくは0.5M～2.0Mの範囲が、最も好ましくは1.0M～2.0Mの範囲が挙げられる。

#### 【0027】

前記金属塩を溶解する溶媒は、細胞培養に支障のない溶媒であれば如何なるものでもよいが、例えば蒸留水、生理的食塩水、HEPES緩衝液（シグマ社）、TRIS緩衝液（シグマ社）、PBS緩衝液（Invitrogen社）、細胞培養培地等を用いることができる。

#### 【0028】

次に、本発明の核酸導入の方法について具体的に説明する。

まず、導入用の核酸と導入対象となる細胞とを培地中で接触させる。接触は、通常の細胞培養に適した培養容器中で行われる。ここで培養容器としては、細胞培養用ディッシュ、フラスコ、マルティプルウェルプレートなどが挙げられる。

核酸と細胞との接触方法としては、例えば、細胞懸濁培地に核酸を添加して細胞培養容器に播く方法、核酸を添加した培地で細胞を懸濁して細胞培養容器に播く方法、細胞を培養培地で懸濁して細胞培養容器に播き、その上に核酸を加える方法、核酸を予め細胞培養容器に添加しておき、その上に細胞を懸濁した培養培地を加える方法、核酸水溶液を予め細胞培養容器に添加して乾固させ、その上に細胞を懸濁した培養培地を加える方法等がある。

接触させる核酸の量（濃度）および細胞数（密度）は、通常の遺伝子導入に用いられる程度であれば特に制限は無い。また接触の温度としては、0℃～42℃の範囲が、より好ましくは室温～37℃の範囲が挙げられる。

#### 【0029】

次に、前記核酸と細胞とを接触させた培地（以下、「工程（a）の培地」と称することもある）に対し、高濃度の金属塩溶液（好ましくは高濃度の塩化カルシウム溶液）を接触

させる。接触方法としては、例えば、工程（a）の培地を含有する培養容器中に高濃度金属塩溶液を添加する方法や、高濃度金属塩溶液を予め細胞培養容器に添加しておき、そこに前記工程（a）の培地を添加する方法等が挙げられる。

#### 【0030】

高濃度金属塩溶液の接触（添加）の時期は特に制限されないが、細胞と核酸を接触後2時間以内、好ましくは30分以内、より好ましくは10分以内に高濃度金属塩溶液を接触させることが適当である。

#### 【0031】

高濃度金属塩溶液（好ましくは高濃度塩化カルシウム溶液）の接触（添加）量は、細胞への核酸導入が良好に行われる限り特に制限されないが、工程（a）の培地 $500\mu\text{L}$ 当たり高濃度金属塩溶液 $1\mu\text{L} \sim 20\mu\text{L}$ を接触（添加）することが好ましい。また、工程（a）の培地 $500\mu\text{L}$ 当たり高濃度金属塩溶液 $2\mu\text{L} \sim 10\mu\text{L}$ を接触（添加）することがより好ましく、工程（a）の培地 $500\mu\text{L}$ 当たり高濃度金属塩溶液 $5\mu\text{L} \sim 10\mu\text{L}$ を接触（添加）することがさらに好ましい。

より具体的には、例えば24穴ウェルにおいては、1ウェルあたり $500\mu\text{L}$ 程度の工程（a）培地を含有するのが一般的であるため、 $1\mu\text{L} \sim 20\mu\text{L}/\text{ウェル}$ 、より好ましくは $2\mu\text{L} \sim 10\mu\text{L}/\text{ウェル}$ 、さらに好ましくは $5\mu\text{L} \sim 10\mu\text{L}/\text{ウェル}$ の高濃度金属塩溶液を添加することが適切である。

#### 【0032】

高濃度金属塩溶液を添加した後、金属塩が均一に工程（a）培地に混合されるように培養容器を攪拌し、1時間～1日程度培養する。培養の条件は、細胞への核酸導入に支障をきたさない限り特に限定されないが、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下、 $0^\circ\text{C} \sim 42^\circ\text{C}$ の範囲で、好ましくは室温～ $37^\circ\text{C}$ の範囲で、より好ましくは $37^\circ\text{C}$ にて行われる。

以上の操作により、核酸の導入が達成される。

#### 【0033】

前記本発明による核酸導入法は、細胞レベルでの遺伝子能解析の他、遺伝子組換え細胞株の作出や、ex vivoの遺伝子治療における細胞への核酸導入にも適用することができる。

#### 【0034】

本発明は、前記本発明の核酸導入法のために用いられる核酸導入剤を提供する。

本発明の核酸導入剤は、固体金属塩または高濃度の金属塩溶液を成分として含有することを特徴とする。

#### 【0035】

ここで「金属塩」とは、細胞培養に影響しない範囲内であれば、如何なる金属塩溶液を用いても良い。細胞培養に影響するか否かは、細胞培養液に金属塩溶液を添加した場合としない場合とで細胞増殖速度（細胞密度）を比較することにより、容易に調べることができる。

具体的には、カルシウム、カリウム、マグネシウム、ナトリウム、マンガン、鉄、銅、または亜鉛等の金属の塩が挙げられる。当該金属の塩として、より具体的には、例えば前記金属の塩酸塩、リン酸塩、硫酸塩、炭酸塩、または硝酸塩等が挙げられる。好ましくは前記金属の塩酸塩が挙げられ、より好ましくは二価金属の塩化物が挙げられる。

ここで二価金属の塩化物としては、具体的には塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化亜鉛、塩化鉄、塩化マンガン等が例示され、好ましくは塩化カルシウムが挙げられる。

以上に示した金属塩は、単独で、若しくは2種以上を組み合わせることにより、本発明の核酸導入剤の成分とすることができます。

#### 【0036】

本発明の核酸導入剤が高濃度の金属塩溶液を成分として含有する場合、その濃度は、0.1M以上であれば如何なる濃度であっても良い。

#### 【0037】

前記したように、工程（a）の培地と接触させる金属塩溶液の濃度としては0.1M～

3. 0Mの範囲が挙げられ、好ましくは0.3M~3.0Mの範囲が、より好ましくは0.5M~3.0Mの範囲が、さらに好ましくは0.5M~2.5Mの範囲が、特に好ましくは0.5M~2.0Mの範囲が、最も好ましくは1.0M~2.0Mの範囲が挙げられる。従って本発明の核酸導入剤における金属塩の濃度は、希釈により若しくはそのまま使用することにより前記の濃度となるように調製されている必要がある。

従って本発明の核酸導入剤が高濃度の金属塩溶液（好ましくは高濃度の塩化カルシウム溶液）を成分として含有する場合、その濃度は、0.1M以上であれば良く、好ましくは0.1M~6.0Mの範囲が挙げられ、より好ましくは0.1M~4.0Mの範囲が、さらに好ましくは0.5M~4.0Mの範囲が挙げられる。

#### 【0038】

前記金属塩を溶解する溶媒は、細胞培養に支障のない溶媒であれば如何なるものでもよいが、例えば蒸留水、生理的食塩水、HEPES緩衝液（シグマ社）、TRIS緩衝液（シグマ社）、PBS緩衝液（Invitrogen社）、細胞培養培地等を挙げることができる。

#### 【0039】

以上のような本発明の核酸導入剤は、核酸導入用のキットの一成分とすることができます。当該キットは、前記本発明の核酸導入剤のみからなるキットであっても、また本発明の核酸導入剤と他の成分とを含むキットであっても良い。当該キット中の他の成分としては蛍光標識オリゴヌクレオチド、ポジティブコントロールsiRNAなどが挙げられる。また当該キットが固体金属塩を成分として含有する場合は、これを溶解する溶媒として、蒸留水、生理的食塩水、HEPES緩衝液（シグマ社）、TRIS緩衝液（シグマ社）、PBS緩衝液（Invitrogen社）、細胞培養培地等をさらに含有していくても良い。

#### 【0040】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 【実施例1】

##### 【0041】

###### 核酸導入法の検討（1）

24ウェル細胞培養プレートの各ウェルに100 $\mu$ g/mLのGFP発現プラスミド水溶液を100 $\mu$ L添加し、冷風を吹きかける方法で乾燥した。ヒト副腎由来上皮細胞である293細胞（ATCC Cell Biology Collection）を10%ウシ血清（FBS）含有DMEM培地（Sigma）に懸濁し、1ウェルあたり $2.5 \times 10^4$ 個（500 $\mu$ L）播種した。細胞播種後直ちに1.7M塩化カルシウム水溶液を0, 1.5, 2.5, 3.5, 5.0, 6.5, 8.0 $\mu$ L添加し、均一となるようにプレートを攪拌した。なお、培地中の最終塩化カルシウム濃度は1.8mM, 7.1mM, 10.2mM, 14.2mM, 19.5mM, 24.8mM, 30.1mMとなる。細胞播種後2日目に蛍光顕微鏡で細胞を観察してGFPを発現している細胞数を計測し、導入効率を算出した。

結果を図1に示す。図1より明らかのように、高濃度（1.7M）の塩化カルシウムを添加することにより、効率良く細胞に遺伝子導入できることが示された。また細胞の形態変化や細胞死は認められなかった。用いた24ウェルプレートでは、各ウェルに添加する1.7M塩化カルシウム溶液の量が2.5~8.0 $\mu$ Lで優れた遺伝子発現効率が得られた。

#### 【実施例2】

##### 【0042】

###### 核酸導入法の検討（2）

予め塩化カルシウム溶液を添加した培地で細胞を懸濁しウェルに播種する以外は実施例1と同様にして、遺伝子導入効率の検討を行った。24ウェル細胞培養プレートに100 $\mu$ g/mLのGFP発現プラスミド水溶液を100 $\mu$ L添加し、冷風を吹きかける方法で乾燥した。塩化カルシウム濃度がそれぞれ1.8mM, 7.1mM, 10.2mM, 14.2mM, 19.5mM, 24.8mM, 30.1mMとなるように培地に予め塩化カルシウム溶液を添加しておき、それぞれの培地を用いて293細胞を懸濁し、1ウェルあたり $2.5 \times 10^4$ 個（500 $\mu$ L）播種した。細胞播種後2日目に蛍光顕微鏡で細胞を観察してGFPを発現している細胞数を計測し、導入効率を算出した。

##### 【0043】

結果を図2に示す。実施例1の結果(図1)と異なり、予め塩化カルシウム溶液を添加した培地で細胞を懸濁しプレートに播種した場合は、遺伝子を導入することが出来なかつた。これら実施例1および実施例2の結果から、細胞内への遺伝子導入促進効果は培地中た。この塩化カルシウム濃度の増加ではなく、塩化カルシウム溶液の加え方に起因することが示された。すなわち、細胞と遺伝子とをあらかじめ混合した後に高濃度の塩化カルシウムと接触させることが重要であることが明らかとなつた。

### 【実施例3】

#### 【0044】

##### 本発明の核酸導入法を用いたHeLa細胞への遺伝子導入

本発明の核酸導入法を用いたHeLa細胞への遺伝子導入

- 24ウェル細胞培養プレートに $100\mu\text{g/mL}$ のGFP発現プラスミド水溶液を $100\mu\text{L}$ 添加し、冷風を吹きかける方法で乾燥した。ヒト子宮頸癌由来上皮細胞であるHeLa細胞(ATCC: Ccl1 Biology Collection)を10%FBS含有DMEM培地(Sigma)に懸濁し、1ウェルあたり $1.5 \times 10^4$ 個( $500\mu\text{L}$ )播種した。細胞播種後直ちに1.7M塩化カルシウム水溶液を $0, 1.5, 2.5, 3.5, 5.0, 6.5, 8.0\mu\text{L}$ 添加し均一となるようにプレートを攪拌した。細胞播種後4日目に蛍光顕微鏡で細胞を観察してGFPを発現している細胞数を計測し、導入効率を算出した。

#### 【0045】

結果を図3に示す。HeLa細胞においても1.7Mの塩化カルシウム溶液を細胞播種後にウェルに添加することにより遺伝子を効率よく細胞に導入できた。また細胞の形態変化や細胞死も認められなかった。このことから、本発明の方法が細胞種に依らないことが示された。

### 【実施例4】

#### 【0046】

##### 本発明の核酸導入法を用いたsiRNAの導入

本発明の核酸導入法を用いたsiRNAの導入

- ヒトFGF-4のmRNAを特異的に抑制するsiRNA(以下hEx3-1と称する)を導入用核酸として用いた。またヒトFGF-4タンパクを強発現する細胞株であるヒト精巣腫瘍由来上皮細胞NEC8(ATCC: Cell Biology Collection)を導入用細胞として用いた。

#### 【0047】

6ウェル細胞培養プレートに $10\mu\text{g/mL}$ のhEx3-1水溶液を $350\mu\text{L}$ 添加し、冷風を吹きかける方法で乾燥した。NEC8細胞を10%FBS含有DMEM培地(Sigma)に懸濁し、1プレートあたり $3.75 \times 10^5$ 個( $1.5\text{mL}$ )播種した。細胞播種後直ちに1.7M塩化カルシウム水溶液を $20\mu\text{L}$ 添加し、プレートを攪拌して均一とした。対照群としてhEx3-1を塗布乾燥していないウェルで同様の操作を行った。細胞播種後3日目に培地を回収して培地中のFGF-4濃度をELISA(Human FGF-4 Quantikine ELISA kit; R&D Systems)で定量した。またウェル中の細胞を回収してタンパク量をBradford法(Bio-Rad Protein Assay; BioRad)で定量した。培地中のFGF-4濃度を得られたタンパク量で徐して、各ウェル中でのFGF-4産生量を算出した。

#### 【0048】

結果を図4に示す。hEx3-1の導入により培地中へのFGF-4の産生が抑制された。すなわちNEC8細胞内にsiRNAが効率よく導入され、siRNAが目的とする作用を良好に發揮することが示された。この結果から本発明の核酸導入法が核酸の種類に依らないことが示された。

### 【実施例5】

#### 【0049】

##### 本発明の核酸導入法を用いた遺伝子一生体由来物質複合体の導入

本発明の核酸導入法を用いた遺伝子一生体由来物質複合体の導入

遺伝子の安定化効果および徐放効果を持つ生体由来物質と遺伝子との複合体が本発明の核酸導入法により導入できるか検討した。

生体由来物質としてはアテロコラーゲン((株)高研)を用いた。

#### 【0050】

200 μg/mLのGFP発現プラスミド水溶液と0.016%のアテロコラーゲン水溶液を等量で混合し、複合体溶液を調製した。24ウェル細胞培養プレートの各ウェルに複合体溶液を100 μL添加し、冷風を吹きかける方法で乾燥した。ヒト副腎由来上皮細胞である293細胞およびヒト子宮頸癌由来上皮細胞であるHeLa細胞(ATCC: Cell Biology Collection)を10%ウシ血清(FBS)含有DMEM培地(Sigma)に懸濁し、1ウェルあたり $2.5 \times 10^4$ 個(500 μL)播種した。細胞播種後直ちに1.7M塩化カルシウム水溶液を5.0 μL添加し、均一となるように種した。細胞播種後2日目に蛍光顕微鏡で細胞を観察してGFPを発現しているプレートを攪拌した。細胞播種後2日目に蛍光顕微鏡で細胞を観察してGFPを発現している細胞数を計測し、導入効率を算出した。

#### 【0051】

結果を図5に示す。図5から明らかなように、1.7Mの塩化カルシウム溶液を細胞播種後にウェルに添加することにより細胞にアテロコラーゲン複合体を導入できた。このことは複合体として核酸を導入することにより核酸の作用持続が図れることを示すものである。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0052】

本発明により、新規な核酸導入法が提供される。本発明の核酸導入法は簡便かつ低細胞毒性で導入効率が高く、しかもローコストである。また細胞や核酸の種類を問わず、幅広く用いることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0053】

【図1】本発明の核酸導入法を用いることにより、GFP発現プラスミドを293細胞へ導入した結果を示すグラフである。

【図2】予め塩化カルシウム溶液を添加した培地で293細胞を懸濁して播種した場合のGFPの発現効率を示すグラフである。

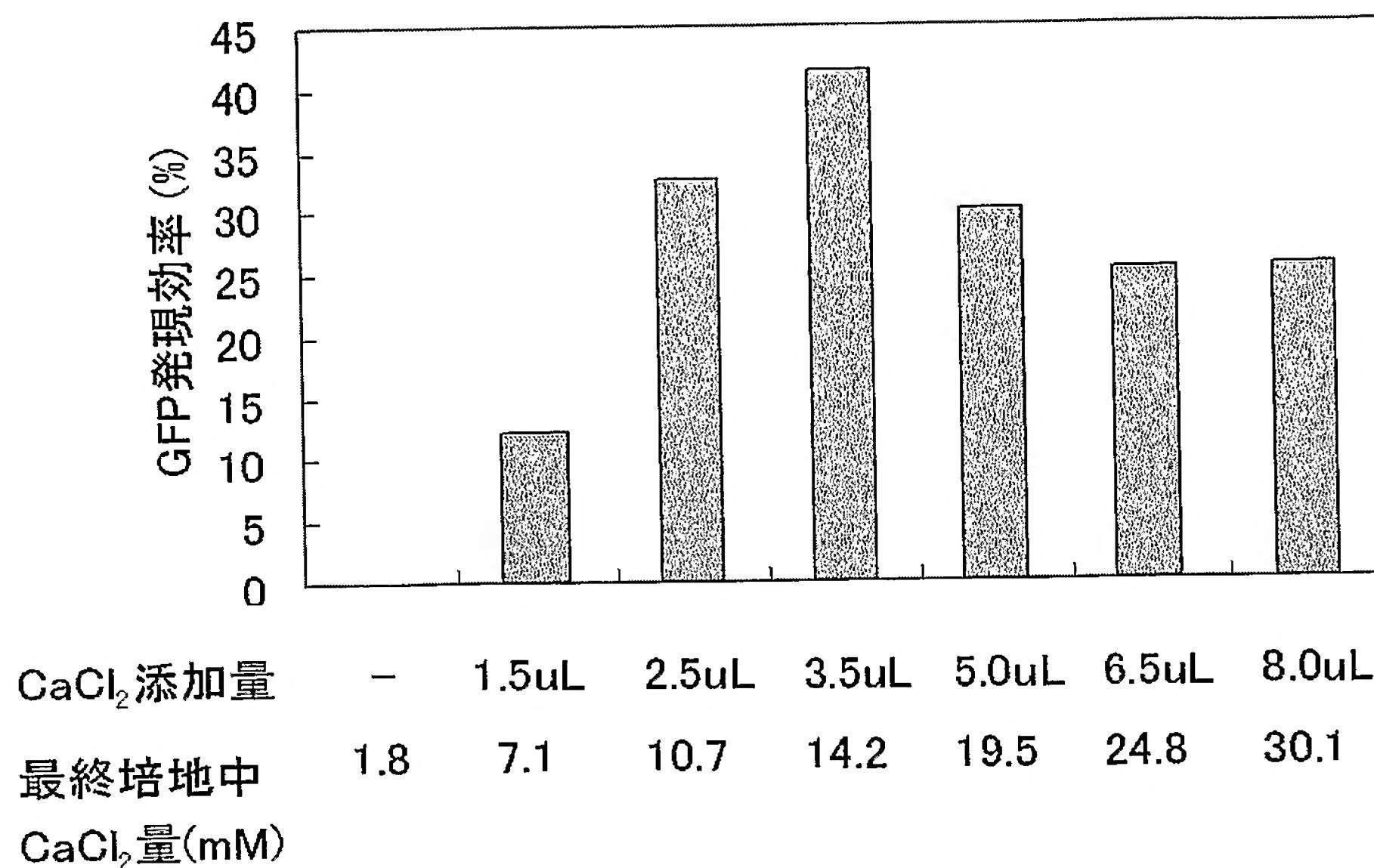
【図3】本発明の核酸導入法を用いることにより、GFP発現プラスミドをHeLa細胞へ導入した結果を示すグラフである。

【図4】本発明の核酸導入法を用いることにより、siRNAをNEC8細胞へ導入した結果を示すグラフである。

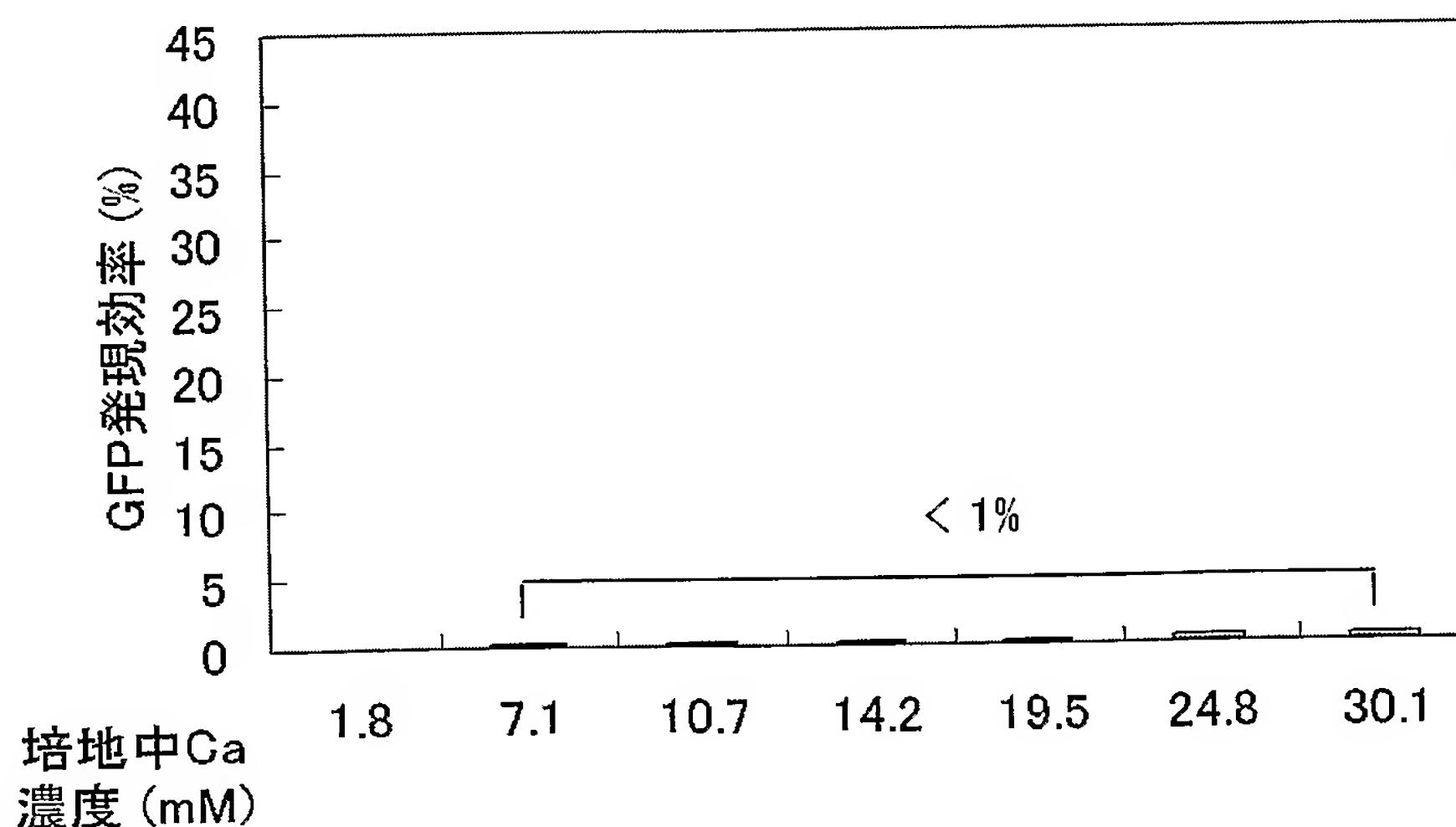
【図5】本発明の核酸導入法を用いることにより、GFP発現プラスミドとアテロコラーゲンとの複合体を293細胞およびHeLa細胞へ導入した結果を示すグラフである。

【書類名】 図面

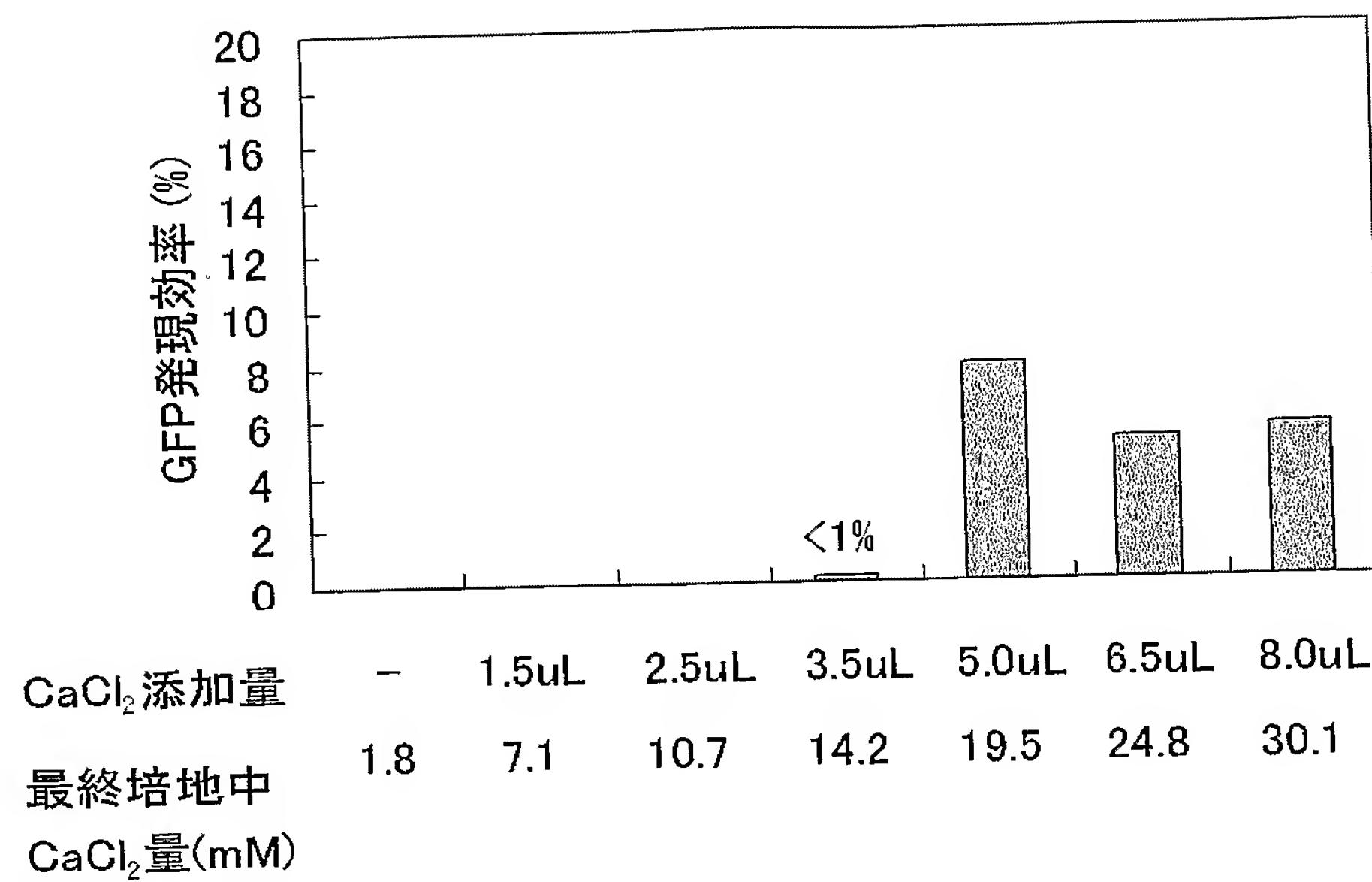
【図 1】



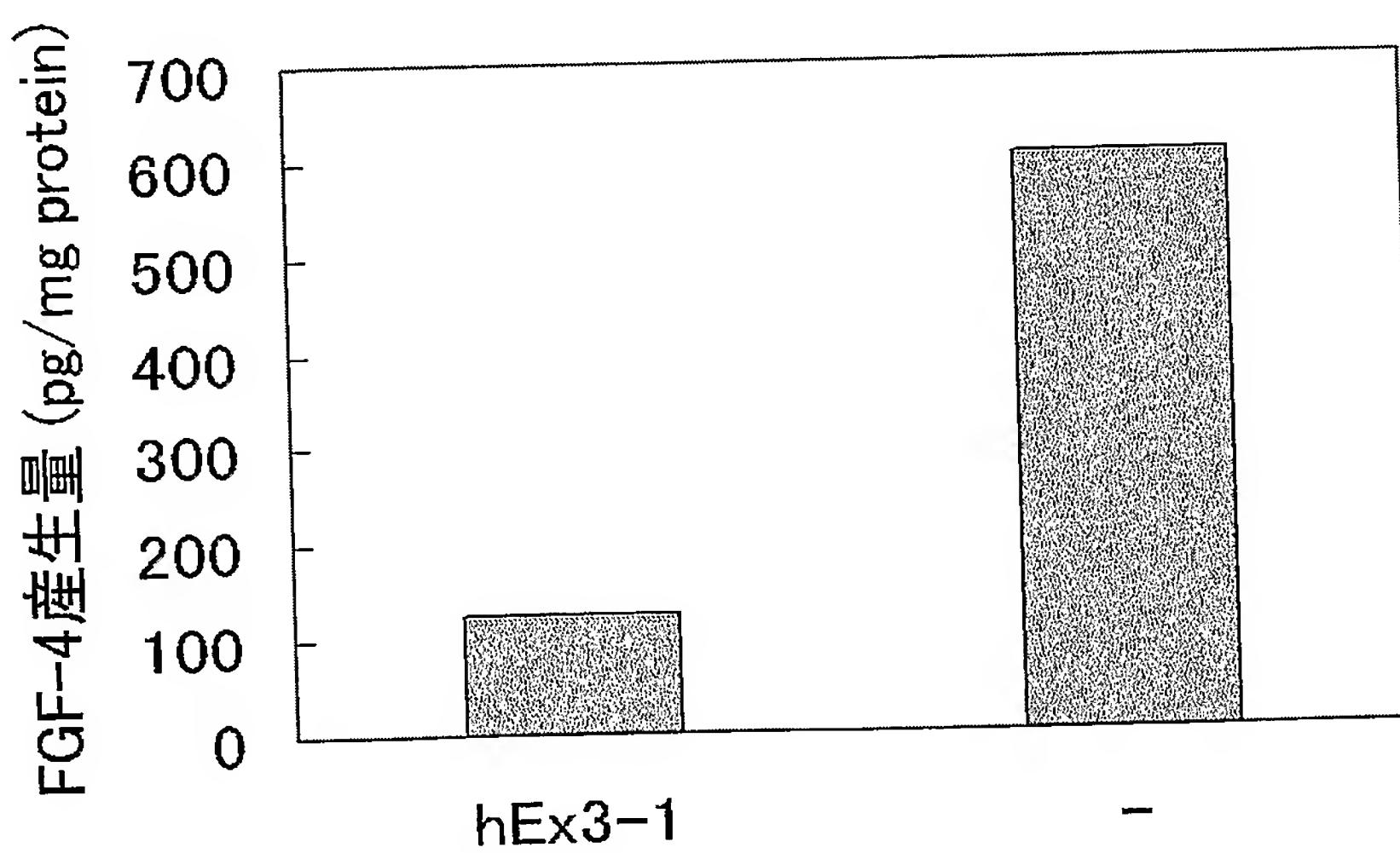
【図 2】



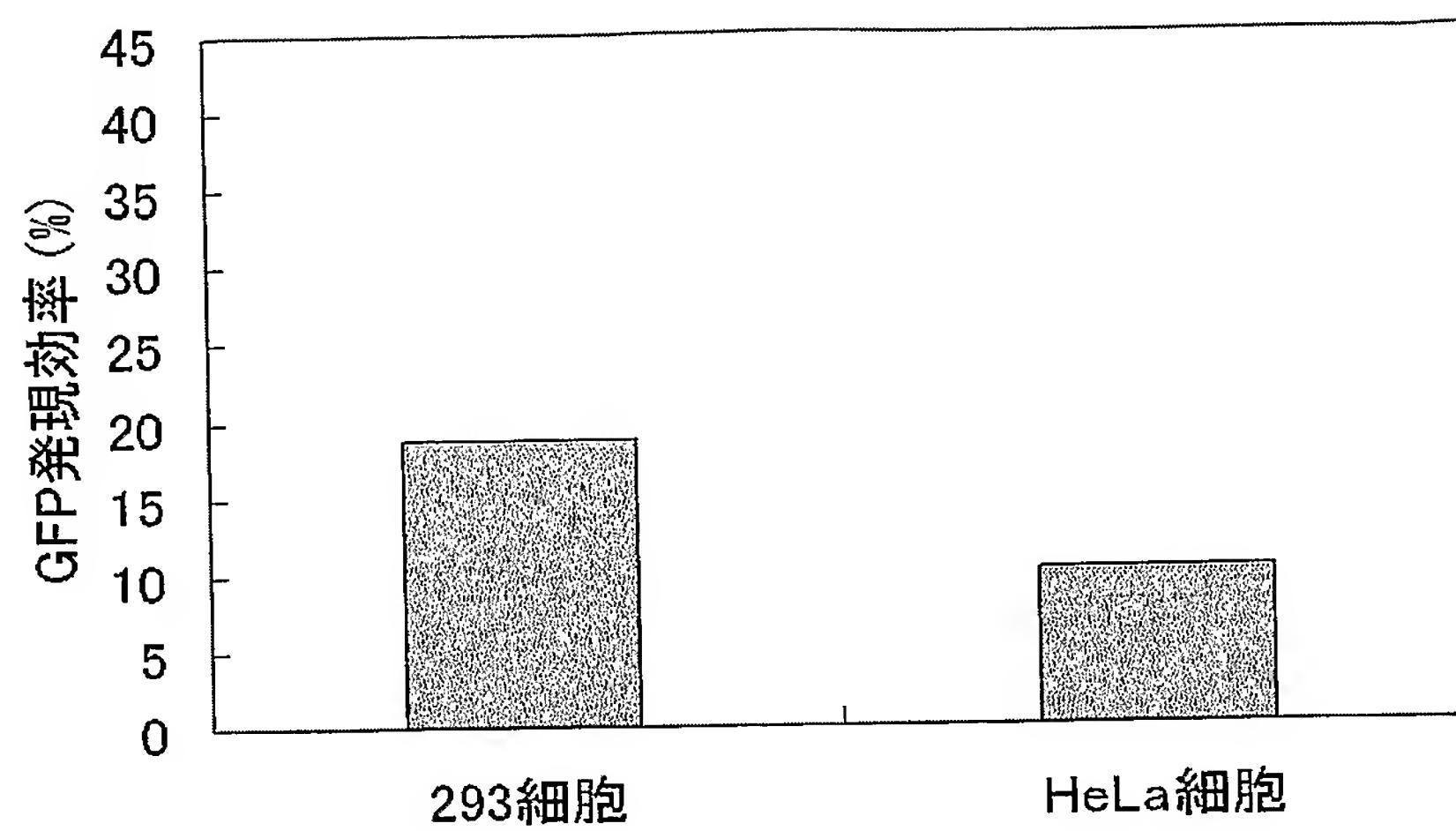
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 新規な核酸導入法および核酸導入剤を提供する。

【解決手段】 (a) 核酸と細胞とを培地で接触させる工程、および (b) 前記 (a) の工程の後、高濃度の金属塩溶液を前記 (a) の培地と接触させる工程、を含む核酸導入法、ならびに固形金属塩または高濃度の金属塩溶液を成分として含有する核酸導入剤。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-423004
受付番号	50302097260
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年12月22日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

【提出日】	平成15年12月19日
-------	-------------

特願 2003-423004

出願人履歴情報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名 住友製薬株式会社

特願 2003-423004

出願人履歴情報

識別番号 [591071104]

1. 変更年月日 2001年 1月19日

[変更理由] 住所変更

住所 東京都豊島区目白3丁目14番3号  
氏名 株式会社高研